动 物 学 研 究 2005, Oct. 26 (5): 551-554 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

一种鸡胚胎心率记录的新方法

车 轶[1,2,3], 孙华英[1,3], 彭沿平[1], 曾 涛[1], 马原野[1,*]
(1. 中国科学院昆明动物研究所, 云南 昆明 650223; 2. 苏州大学生命科学学院, 江苏 苏州 215006;
3. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 鸡胚胎是一种被广泛应用于发育生物学研究的实验材料。在以鸡胚胎为动物模型的各项研究工作中, 心率常被看作是一个很重要的反应胚胎生理活动指标。本文详细介绍了一种侵入性的心电记录新方法, 在正常的生理条件下通过记录鸡胚胎心电的变化来监测心率。首先在蛋壳上钻孔, 将电极插入蛋内, 然后通过放大器放大, A/D 板转换, 将心电信号输入电脑进行分析处理, 提取与心率相关的信息。这种记录方式对胚胎损伤较小, 不影响胚胎的正常发育; 具有灵敏度高, 操作简单, 容易掌握等特点。

关键词: 鸡胚胎; 心率; 侵入性记录法
中图分类号: Q337; Q132 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254-5853 (2005) 05-0551-04

A New Method for Heart Rate Recording in Chick Embryo

CHE Yi[1,2,3], SUN Hua-ying[1,3], PENG Yan-ping[1], ZENG Tao[1], MA Yuan-ye[1,*]
(1. *Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Science, Kunming* 650223, *China;*
2. *School of Life Science, Suzhou University, Suzhou* 215006, *China;*
3. *Graduate School of the Chinese Academy of Science, Beijing* 100039, *China*)

Abstract: The chick embryo is a widely used experimental animal in developmental biology research. Heart rate (HR) is usually considered to be an important physiological index reflecting the embryo's natural activity. The paper introduces in detail a new invasive method for heart rate recording. With wire electrodes implanted by drilling small holes in the egg's shell, signals are amplified and digitised using an A/D converter. The heart rate (HR) could be measured under normal physiological conditions, and thus the normal embryonic development is not significantly affected by the recording procedure. In addition, the signals are large in amplitude and easy to manipulate.

Key words: Chick embryo; Heart-rate (HR); Invasive recording

鸡胚胎是一种被广泛应用于发育生物学研究的实验材料。以鸡胚胎为实验材料进行发育生物学方面的研究有很多优点: 首先, 由于鸡胚胎在发育过程中与母体是分离的, 所以研究鸡胚胎的发育可以排除来自母体的各种影响和干扰; 其次, 鸡胚胎发育速度比较快, 胚胎发育所需要的温度、湿度等条件比较容易控制, 胚胎发育各个阶段的特征比较明显。基于以上优点, 在进行药理学、生理学、心理学等方面的研究时, 科研人员常用鸡胚胎建立动物模型。在以鸡胚胎为动物模型进行各种研究工作时, 胚胎的心率常被看作是一个很重要的反应胚胎生理活动的指标。除了研究心血管系统的胚胎发育需要监测心率的变化外, 在进行药理及发育神经生物学方面的研究工作时, 也常常需要监测心率的变化 (Moriya et al, 2000; Ikonomov et al, 2000; Reynoids & Lickliter, 2002)。鸡胚胎心率可以通过以下 3 种途径进行监测: 记录心电变化, 通过张力传感器记录心脏的张力变化, 以及通过压力传感器记录尿囊内的压力变化。以上几种途径都有自身的优点和缺点, 在研究工作中可以根据实验的具体要求选择不同的途径来设计心率记录的方法 (Moriya et al, 1999; Akiyama et al, 1999)。目前有关鸡胚

收稿日期: 2005-03-08; 接受日期: 2005-06-28
*通讯作者 (Corresponding author), E-mail: yuanma0716@vip.sina.com

胎心率监测方法的报道都不够详细，大多只是在文章的材料方法部分进行简单的描述，读者根本无法从中获得足够的信息来设计实验装置进行心率的监测（Reynoids al，2002）。近来我们系统研究了吗啡对胚胎发育和新生幼体学习记忆功能的影响，在此过程中我们利用自己设计制作的心率记录装置，对鸡胚胎的心率进行了监测，并且获得了非常理想的结果。以下将详细介绍我们监测心率所采用的方法和装置。

1 材料方法

1.1 实验动物

实验用罗曼鸡胚购于云南省种鸡场，鸡胚购得后放在自动孵化箱中孵化，孵化箱的温度为37.8℃，相对湿度为50%～60%。待鸡胚孵化到15日龄时，开始对鸡胚的心率进行监测。

1.2 心率记录装置

我们所设计的心率记录装置主要包括电脑、A/D板、主放大器、前置放大器、电极、恒温记录箱等。各组件间的连接如图1，鸡胚的心电信号经放大器放大，通过A/D板转换，然后计算机利用我们编制的程序即可以对心电信号进行采集分析。

用于记录心率的放大器为运算放大器，包括前置放大器和主放大器，放大倍数5000倍。前置放大器原理如图2所示，前置放大器无电压放大作用，主要起到放大电流的作用。主放大器的原理如图3所示，其放大倍数主要由R1和R2的比值来定，R3和R4的功能主要是为输入端口提供一个稳定的直流工作点，电容C1和C2是隔直流电容（Ma & Wang，2003）。恒温箱长和宽为30 cm，高40 cm。为了便于观察和保温，箱的前壁用双层玻璃制成，箱内温度通过水浴恒温装置维持在（37±0.5)℃，如图1所示，在恒温箱内安装一个照蛋灯，在插入电极时可以通过照蛋灯来观察胚胎位置，在记录心率时鸡蛋可以放置在照蛋灯上。记录电极用直径200 μm的有一定硬度的不锈钢丝制作而成，用细砂纸将不锈钢丝表面抛光，然后将不锈钢丝在直径0.8 cm的塑料杆上绕5～10圈，即制成如图4所示的螺旋状电极。

1.3 心率记录方法

鸡胚的心电描记需要3根电极，分别作为记录电极、参考电极和地线。鸡蛋从孵化箱中取出后要在尽可能短的时间内将电极插好。首先用直径0.4 mm的电钻在鸡蛋二分之一偏上位置钻一个孔。在给鸡蛋钻孔时用力要轻，以免钻头插入蛋内，最好是刚好钻破蛋壳而内膜没有被破坏。如果在钻孔时内膜被破坏了，应该立即用熔化的石蜡将孔封好，然后再插电极。石蜡很软不会影响电极的插入。钻头和电极在使用前应在酒精中浸泡消毒，以免造成鸡胚胎被细菌污染。将用酒精消毒的电极通过事先在鸡蛋壳上钻好的孔插入蛋内。只要将螺旋状电极的螺旋部分旋入3～4圈即可，电极插入以后，用熔化的石蜡将插入电极的孔封好，再用胶纸将电极固定在蛋壳表面。第一根电极插好以后，先在照蛋灯下观察胚胎在蛋壳内的位置，然后根据胚胎的位置选择确定另外两个要插入的电极的位置，三根电极之间要保持尽可能远的间距。电极位置确定以后用同样方法将另外两根电极插入并固定。电极插好以后，放置在恒温箱内适应30 min以后即可以开始记录心率了。心率记录完成以后，将插有电极的鸡胚直接放回孵化箱继续孵化并在之后几天利用这几根电极连续记录心率。

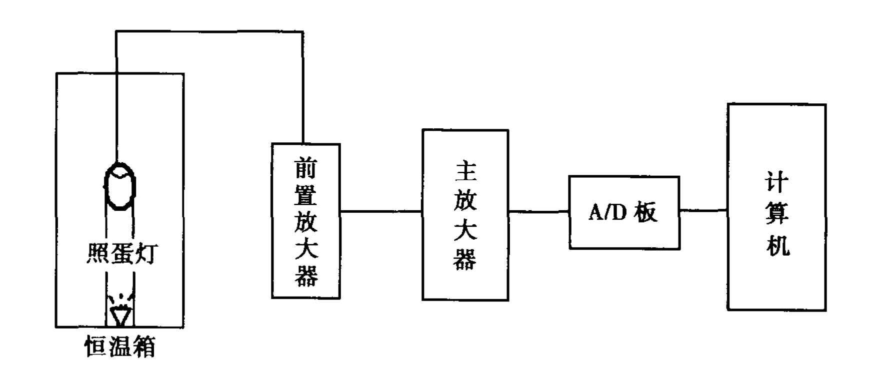


图1 系统流程图

Fig. 1 System flow chart

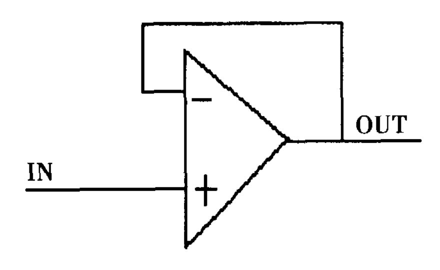


图 2 前置放大器原理图
Fig. 2 Schematic diagram of the pre-amplifier

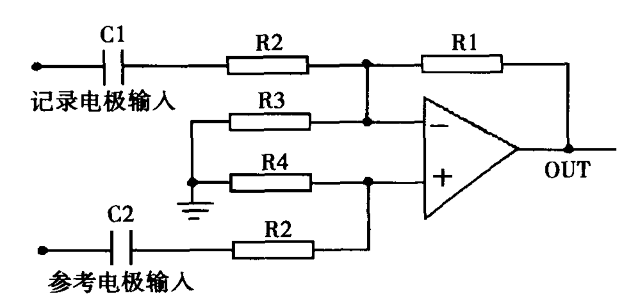


图 3 主放大器原理图
Fig. 3 Schematic diagram of the main amplifier

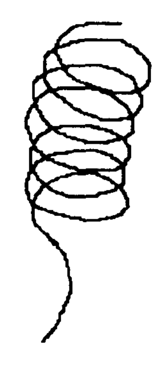


图 4 螺旋状电极模式图
Fig. 4 Plan of the helix electrode

2 结 果

在胚胎发育到 15 d 时，我们对胚胎的心率进行了监测，如图 5 所示。在 37 ℃时，平均心率在 240 ~ 300 次/min 之间波动。心率很容易受温度变化的影响。在一定范围内，温度降低心率减慢，温度升高心率加快。当温度低于 36 ℃时，心率可降到 160/min 次以下，当温度高于 38 ℃以上时，心率可以达到 340 次/min 以上。

我们在研究中注意到胚胎的心率很容易受到外界环境因素的干扰，轻微的振动、温度变化以及一些化学药物都可以引起胚胎心率的改变。

在胚胎发育期间插入电极的鸡胚大多数可以正常孵化,孵化率可以达到 70%以上,可见插入电极对鸡胚的孵化率影响不是很大。小鸡出壳时我们观察发现,电极只是贴在鸡胚的体表,并没有插入鸡胚体内,因此没有对鸡胚的孵化产生明显的影响。

3 讨 论

在以鸡胚为动物模型进行发育神经生物学、发育心理学、胚胎药理学等方面的研究工作时，常常把心率作为重要的生理指标来进行监测。根据传感器和信号采集途径的不同可以将心率监测方法分成侵入性和非侵入性两大类。

非侵入性的心电监测方法是一种无创伤的监测方法,如声音心电图ACG(acousticcardiogram)和心冲击描记图 BCG（ballistocardiogram）均属此类。这种方法是在不破坏蛋壳的前提下，从蛋壳表面收集胚胎的心源性信号，监测心率。例如，ACG 是通过测量穿过蛋壳的声音压力的改变来检测心率，在孵化的晚期，将一个微型麦克风密封地贴附在蛋壳表面，收集蛋壳内胚胎所发出的声音信号，并对所收集的声音信号进行分析处理，从中筛选出和胚胎心率相关的信息，进而达到监测心率的目的。由于胚胎早期的声音信号很微弱，因此这种方法在胚胎发育的后期使用效果好，另外这种方法灵敏度很低，记录到的信号有限，容易受到各种外界因素的干扰（Akiyama et al，1999）。

侵入性的血压测量法，利用了鸡胚胎外具有一层坚固的蛋壳的特点，在蛋壳上开一个小洞，直接将一根很细的导管插入尿囊，通过压力传感器检测尿囊内压力的变化，以达到监测心率的目的。这种方法可以在孵化的后半期监测心率，提高了灵敏度，使记录到的生理信号明显增强，克服了非侵入性方法灵敏度低、易受外界因素干扰的缺陷。但是该方法同样存在一些问题，例如不能检测早期的心率；技术操作要求较高，给实验操作造成了一定的难度；对鸡胚的损伤很大，记录结束以后鸡胚胎不能正常孵化（Moriya et al，1999）。

我们设计采用的方法为侵入性心电记录方法，即通过检测鸡胚心电的变化来监测心率。Reynoids & Lickliter（2002）在研究视觉和听觉等各种感觉刺激对胚胎生理和行为影响时，曾利用这种方法监测胚胎心率：在胚胎发育晚期直接将蛋壳打开，将鸡胚的头颈部暴露出来，将没有吸收的卵黄囊和腹部留在蛋壳内，将电极直接插到鸡胚的翅膀下来纪录心电，在实验中取得了比较理想的记录结果。该方法具有操作简便、成功率高、灵敏度高等显著特

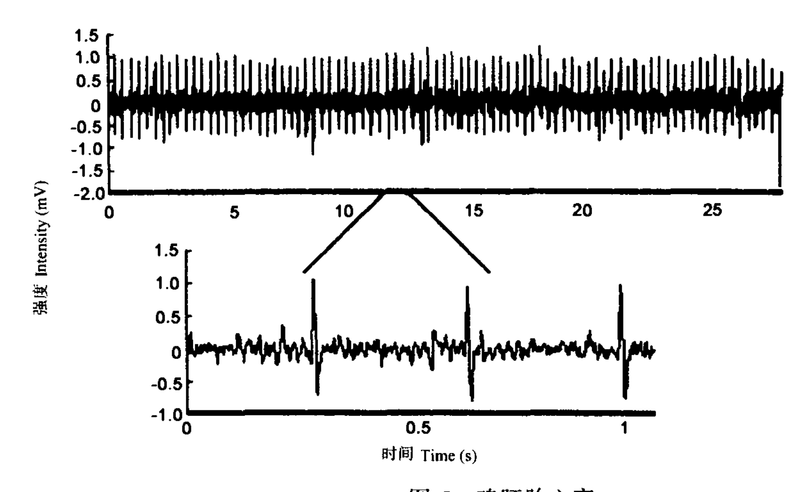


图 5 鸡胚胎心率
Fig. 5 Heart rate of the chick embryo

点，但是也存在如下局限性：只适合在胚胎发育晚期（19、20 d），即胚胎发育基本完成、小鸡即将破壳而出时进行心率监测；胚胎受到的创伤比较大，实验结束后鸡胚胎无法正常孵化。本研究的记录方法和 Reynoids & Lickliter（2002）的方法在工作原理上是相同的：都是通过记录心电来监测心率变化，因此继承其灵敏度高的显著特点，但是和 Reynoids & Lickliter（2002）设计的方法比较，我们设计的方法在具体操作上有了很多改进：第一，在记录时只是在蛋壳上钻了一个直径 0.4 mm 的小洞，蛋壳没有受到严重破坏，避免了因蛋壳破坏而导致的各种刺激和干扰，使记录到的信号更接近于正常生理条件下的信号；第二，对鸡胚的伤害性较小，完成心电记录以后的鸡胚胎大多数可以继续正常孵化，孵化率可以达到 70% 以上，这为以后进行连续研究提供了可能性；第三，可以在相对比较早的发育阶段，即胚胎发育到第 15 天开始进行心率监测，这种长时程记录心电变化的方法，可以监测鸡胚在孵化过程中的生理和行为变化过程，适合长期监测鸟类的不规则心率；第四，比较简便，整个检测系统，从电极、放大器的制作，到记录软件的编程，都可以自行制作完成，同时实验操作过程也比较简单容易掌握。

总之，侵入性和非侵入性的鸡胚胎心率监测方法各有自身的优点和缺点。侵入性记录方法灵敏度高，但是创伤大；非侵入性记录方法对鸡胚胎没有损伤，但是灵敏度相对比较低。我们设计的这种侵入性记录方法，在保持其灵敏度高的特点的同时，还最大限度地减少了对鸡胚胎的损伤，可以保证胚胎的孵化率达到 70% 以上。另外，鸡胚胎在两日龄时就已经有了心跳，但是在胚胎发育早期心跳信号很微弱，因此如何在相对比较早的时期记录到心跳信号一直是一个难题。我们通过提高放大器的放大倍数，提高信噪比，改善屏蔽效果，改变记录电极的形状等手段提高了整个记录装置的灵敏度，确保记录装置可以在相对比较早的时期监测到心率以及在胚胎发育到第 15 天记录到理想的心电信号。

参考文献：

Akiyama R, Matsuhisa A, Pearson JT, Tazawa H. 1999. Long-term measurement of heart rate in chicken eggs [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology* (*Part A*), **124**: 483-490.

Ikonomov OC, Petrov T, Soden K, Shisheva A, Manji HK. 2000. Lithium treatment in ovo: Effects on embryonic heart rate, natural death of ciliary ganglion neurons, and brain expression of a highly conserved chicken homolog of human MTG8/ETO [J]. *Developmental Brain Research*, **123**: 13-24.

Ma YY, Wang JH. 2003. Principle and Method of Cognitive Neuroscience [M]. Chongqing China: Chongqing Publishing company, 423-428. (马原野, 王建红. 2003. 认知神经科学原理和方法. 重庆: 重庆出版社, 423-428.)

Moriya K, Hochel J, Pearson JT, Tazawa H. 1999. Cardiac rhythms in developing chicks [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology* (*Part A*), **124**: 461-468.

Moriya K, Pearson JT, Burggren WW, Tazawa H. 2000. Continuous measurements of instantaneous heart rate and its fluctuations before and after hatching in chickens [J]. *The Journal of Experimental Biology*, **203**: 895-903.

Reynoids GD, Lickliter R. 2002. Effects of prenatal sensory stimulation on heart rate and behavioral measures of arousal in bobwhite quail embryos [J]. *Dev Psychobiol*, **41**: 112-122.